

Formation nouveaux entrants

Centre National de la Recherche Scientifique et Ecole Normale Supérieure rue d'Ulm

4 décembre 2012

Les risques biologiques en laboratoire et leur prévention

Christian BLEUX
CNRS
christian.bleux@univ-paris-diderot.fr
christian.bleux@recherche.gouv.fr



C. Bleux - CNRS



Modèles Biologiques



Micro-organismes
Organismes génétiquement modifiés
Cultures Cellulaires
ATNC
Expérimentation animale

Contaminations au laboratoire dues à divers micro-organismes

(Sulkin puis Pike, 1978)

Type de micro-organisme	Nombre de cas recensés(%)	Nombre de décès	Nombre d'agents biologiques	Nombre de cas publiés
Bactéries	1704 **(42)**	71	37	744
Virus	1179 **(29)**	55	85	915
Rickettsies	598 (14)	25	8	381
Champignons	354 (09)	5	9	313
Chlamidiae	128 (03)	10	3	71
Parasites	116 (03)	2	17	74
Total	4079 (100%)	168	159	2498

Infections les plus fréquentes contractées au laboratoire

(Pike 1978)

Infections	Nombre de cas	Nombre de décès
Brucellose	426	5
Fièvre Q	280	1
Hépatites	268	3
Fièvre typhoïde	258	20
Tularémie	225	2
Tuberculose	194	4
Dermatomycoses	162	0
Encéphalite équine du Vénézuéla	146	1
Psittacose	116	10
Coccidioïmycose	93	2

Risques liés aux agents pathogènes

Etablissement de la classification des niveaux de risques:

- La pathogénicité du micro-organisme et sa virulence
- La résistance du micro-organisme dans l'environnement
  - Chaleur, froid
  - Dessiccation
  - Antiseptiques
- Le mode de contamination
  - Voie pulmonaire
  - Voie digestive
  - Voie cutanée et transcutanée
  - Voie conjonctivale
- L'existence d'un traitement efficace
  - Préventif: vaccination
  - Curatif: antibiotiques…

Décret 94-352 du 4 mai 1994

Protection des travailleurs
contre les risques résultant
de leur exposition à des
agents biologiques pathogènes

Articles R. 231 – 60 à R. 231 – 65 – 3 du code du travail

Arrêté du 18 juillet 1994

Liste des agents biologiques pathogènes publié au journal officiel du 30 juillet 1994 et modifiée par l'arrêté du 30 juin 1998

Définition des groupes de risques des agents biologiques pathogènes

Groupe	Risque infectieux	Risque de propagation	Prophylaxie ou traitement
1	Ne provoquent pas de pathologies	Sans objet	Sans objet
2	Peuvent provoquer une maladie	Peu probable	Oui
3	Peuvent provoquer une maladie	Possible	Généralement possible
4	Provoquent une maladie grave	Élevé	Inconnu à ce jour

CLASSIFICATION DES MICRO-ORGANISMES

1	Saccharomyces Escherichia coli Bacillus subtilis
2	Virus de l'hépatite A Staphylococcus aureus Virus d'Estein-Barr Adénovirus Legionella pneumophila
3	Mycobacterium Virus Chikungunya Plasmodium falciparum Virus de l'hépatite B et C VIH
4	Arenavirus (Lassa) Virus des fièvres hémorragiques (Crimée-Congo, Marbourg, Ebola) Poxvirus (Variole) Flavivirus (encéphalite)

Arrêté du 13 août 1996

Fixant les mesures techniques, notamment de confinement à mettre en œuvre dans les industries et les laboratoires de recherche et/ou d'enseignement où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.

Arrêté du 16 juillet 2007

- Laboratoires d'analyses de biologie médicales, y compris ceux des établissements publics de santé
- Laboratoires de contrôle en milieu industriel et agricole
- Laboratoires d'anatomie et cytopathologie
- Laboratoires d'autopsies ou dissections

Confinements des niveaux de sécurité

Groupe 1	Laboratoire L1	Animalerie A1	Serre S1
Groupe 2	Laboratoire L2	Animalerie A2	Serre S2
Groupe 3	Laboratoire L3	Animalerie A3	Serre S3
Groupe 4	Laboratoire L4	Animalerie A4	Serre S4

Mise en œuvre des niveaux de confinement

- Conception du laboratoire
- Aménagements internes
- Bonnes pratiques de laboratoire

Le laboratoire standard L1

Conception du laboratoire

- Surfaces lisses, faciles à nettoyer et résistantes aux agents détergents et de désinfection
- Absence d'endroits difficilement accessibles au nettoyage
- Présence d'un évier ou d'un lavabo
- Présence d'un autoclave dans le bâtiment

Equipement du laboratoire

- Pas d'équipement spécial de confinement

Le laboratoire standard L1

Bonnes pratiques de laboratoire

- Connaître les consignes de sécurité et la conduite à tenir en cas d'accident
- Interdiction de boire, manger, fumer, se maquiller…
- Plans de travail désinfectés
- Lavage des mains
- Port de blouse obligatoire
- Port de gants, de lunettes de protection et/ou de masque (ceci dépend de la manipulation réalisée)

Le laboratoire standard L1

Bonnes pratiques de laboratoire, suite et fin

- Utilisation de matériel à usage unique
- Eviter, si possible, l'emploi d'aiguilles et de matériel en verre
- Aiguilles et matériels coupants récupérés dans des containers spéciaux de type « safetybox ». Ne pas recapuchonner les aiguilles
- Ne pas pipeter à la bouche, utiliser un système d'aspiration et de refoulement mécanique de type « pipetaid »
- Minimiser la formation d'aérosols
- Lors des centrifugations, privilégier l'utilisation de tubes hermétiquement fermés



DANGER BIOLOGIQUE

ACCES RESERVE AU SEUL PERSONNEL AUTORISE

Chercheur responsable du laboratoire

Mr X
Pièce 702
7 52 29
06 22 22 22 22

Chercheurs autorisés

Melle A – Staphylococcus Aureus
Mme B – Virus Hépatite A
Mr C – legionella pneumotropica

En cas d'urgence, appeler

Service Hygiène et sécurité: 7 59 55
Médecine de prévention: 14
Sécurité incendie: 18

Le laboratoire L2



Conception du laboratoire

- Accès réglementé et vérouillable
- Fermeture de porte automatisée
- Robinet d'eau à commande non manuelle
- Présence d'un oculus permettant de voir les occupants
- Etanchéité du local possible afin de pouvoir le désinfecter par fumigation

Le laboratoire L2

Equipement du laboratoire

- Poste de Sécurité Microbiologique de type II (PSM II)

  EN 12469 ou NFX 44-201 - LNE

- Autoclave de préférence à l'étage
- Centrifugeuse à rotor étanche ou centrifugation en utilisant des tubes étanches
- Incubateur à CO_2
- Présence de tout le petit matériel de pipetage automatique
- Moyen de communication avec l'extérieur du local
- Climatisation du laboratoire afin que la porte reste fermée pendant l'exécution de la manipulation

Le laboratoire L2

Bonnes pratiques de laboratoires

- Afficher clairement la conduite à tenir en cas de contamination
- Port d'une blouse spéciale obligatoire, facilement identifiable. Elle sera retirée après la manipulation et restera dans le local
- Port de gants obligatoires. S'assurer que le jonction entre gants et manches de blouse est totale
- Port de masque* et/ou de lunettes** de protection optionnel
  - * Si risque chimique associé
  - ** Si risque de contamination aérosolique
- Broyage des tissus et des cellules réalisées sous PSM II

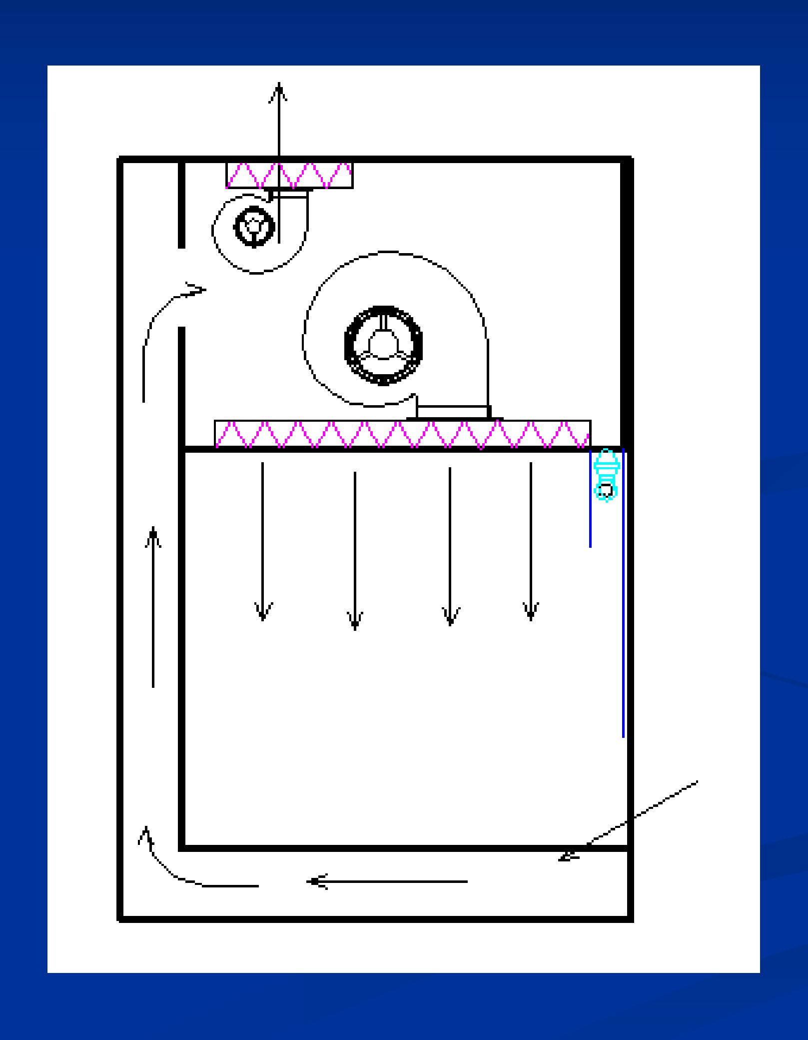
Le laboratoire L2

Bonnes pratiques de laboratoires suite et fin

- Eviter au maximum la création d'aérosols et de projections
- Après centrifugation, ouvrir les rotors ou récipients étanches sous PSM II
- Inactiver le matériel contaminé et les déchets. Si l'inactivation est effectuée à l'extérieur du L2, transporter le matériel dans un container étanche

Postes de Sécurité Microbiologique II (PSM II)

NF X 44-201- EN 12469 - LNE

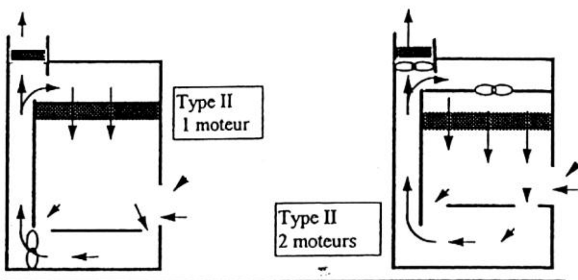


Principales caractéristiques des enceintes à circuit d'air ouvert utilisées

PROTECTION

- du matériel : **très bonne**
- du manipulateur : **très bonne**

*Enceintes classées **type II** pour la protection du manipulateur*

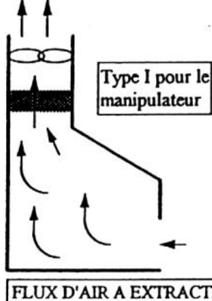


FLUX LAMINAIRE VERTICAL EN DÉPRESSION À RECYCLAGE PARTIEL

PROTECTION

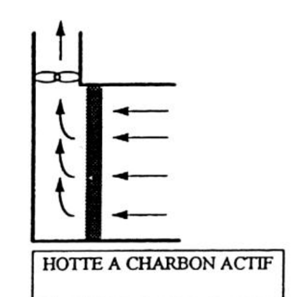
- du matériel : **aucune**
- du manipulateur : **bonne**

Peuvent être dangereuses si le filtre n'est pas vérifié périodiquement



Type I pour le manipulateur

FLUX D'AIR A EXTRACTION TOTALE

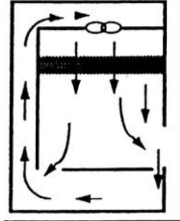


HOTTE A CHARBON ACTIF

PROTECTION

- du matériel : **bonne**
- du manipulateur : **faible**

ces enceintes ne sont pas classées pour la protection du manipulateur



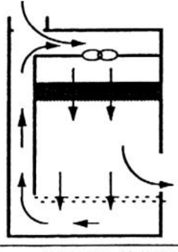
Dans certaines enceintes le plan de travail est entièrement perforé pour améliorer la protection des manipulations

FLUX LAMINAIRE A RECYCLAGE TOTAL

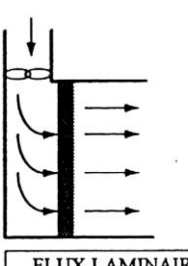
PROTECTION

- du matériel : **bonne**
- du manipulateur : **aucune**

Enceintes non classées pour la protection du manipulateur



FLUX LAMINAIRE VERTICAL EN SURPRESSION A RECYCLAGE PARTIEL



FLUX LAMINAIRE HORIZONTAL

PSM II

Vérification et entretien régulier
Des contrôles doivent avoir lieu:

- Lors de la réception du PSM
- Lors du changement du/des filtre(s) HEPA
- Lors de tout déplacement du PSM
- Après toute projection de liquide sur le filtre HEPA
- Lors de l'apparition d'une contamination du produit manipulé
- Systématiquement au moins une fois par an (contrat d'entretien)

PSM II

L'utilisation répond à des obligations minimales:

- Nettoyer l'intérieur de l'enceinte à l'alcool ou désinfectant type Incidine SP. Pas d'eau de javel.
- Nettoyer, dépoussiérer, aseptiser tout objet devant être introduit dans l'enceinte. Ne pas y introduire de matériel réputés polluants.
- La zone stérile de l'enceinte n'est pas un placard de rangement. Evitez d'encombrer le volume de travail, car cela perturbe le flux laminaire.

PSM II

L'utilisation répond à des obligations minimales:

- Pas de sources de chaleur de type bec bunsen. Risque de brûler le filtre HEPA ou tout du moins de l'endommager
- Pas de désinfection par rampe UV germicide d'une durée supérieure à un quart d'heure. Leur utilisation prolongée détériore la structure du matériau

Procédés de désinfection, décontamination et inactivation

- Afficher en termes clairs le mode d'emploi des méthodes de désinfection utilisées

- S'assurer que ce mode d'emploi a été bien lu, bien compris et qu'il est bien respecté

Désinfection des surfaces (sols, murs, paillasses)

- **Eau de javel à 1 ou 2°Cl (bon spectre d'action bactéricide et virucide). Champignons et levures.**
  - Dilutions hors bouteilles alimentaires
  - Pas d'utilisation en présence d'acide
  - Instabilité dans le temps
  - Contact une demi-heure minimum
- **Ethanol à 70° GL**
- **Incidine SP**

Elimination des déchets biologiques

L'élimination des déchets à risques infectieux et assimilés est réglementé par le décret n° 97-1048 du 6 novembre 1997

- Le producteur de déchets (quelle qu'en soit la nature) en est responsable jusqu'à son élimination totale

- On entend par élimination l'ensemble des étapes de collecte, transport, stockage, tri et traitement
(loi du 15 juillet 1975 modifiée)


Questions ?

Organismes génétiquement modifiés

Tout organisme vivant dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle.

micro-organismes
Cellules eucaryotes
organismes animaux
organismes végétaux

Entités vivantes, biologiquement actives, c'est-à-dire capables de transférer l'ADN à d'autres organismes et qui peuvent se disséminer dans l'environnement.

C. Bleux - CNRS

Organismes génétiquement modifiés

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/utilisation-confinée-d'OGM/index.html

- Insert : ADN, gène ou séquence de gène…
- Vecteur : plasmide, phage, vecteur viral…
- Hôte : bactéries, cellules eucaryotes, animal, plante…

C'est l'association Insert-vecteur-hôte aboutisssant à l'OGM qui fait l'objet du classement avec risque maximum retenu

Organismes génétiquement modifiés
Ancienne classification

Groupe I	Classe 1
Groupe II	Classe 2, 3 et 4

Décret n° 2011-1177 du 23 septembre 2011 relatif à l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés

http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/utilisation-confinée-d'OGM/index.html

Groupes I, II, III, IV

- *Groupe I* — *Soumis à simple déclaration, gratuité*

- *Groupes II, III, IV* — *Soumis à demande d'agrément d'utilisation*
  Soumis à paiement

- *Notification au Demandeur :* *45 jours pour groupes I et II*
  90 jours pour les groupes III et IV

Dématérialisation des dossiers au 1er janvier 2013

C. Bleux - CNRS

Classes de risques des séquences cellulaires manipulées - OGM

Séquences	Catégorie
Récepteurs hormonaux	B
Facteurs de croissance et leurs	B
récepteurs	B
Interleukines 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	B
11, 12, 13, 15, 16	B
Lymphokines MIF, LIF…	B
Interférons α, β, γ	B
Chimiokines MIP 1a, 1b…	B
Substance P	B

Procédure actuelle de demande d'agrément pour l'utilisation d'OGM

Loi N° 92-654 du 13 juillet 1992

La manipulation d'OGM ne peut être entreprise qu'après obtention d'un agrément délivré par le **comité scientifique du HCB**

- Agrément demandé par le directeur du laboratoire
- Nécessité de remplir un dossier par groupe d'OGM
- Toute modification du projet scientifique doit faire l'objet d'une nouvelle demande
- L'expérimentation ne peut débuter qu'après le retour du dossier avec notification par la CGG du niveau de risque
  - Conformité des locaux et niveaux de confinement compatible ave le groupe de risques des OGM
  - Formation des personnels habilités à manipuler

Procédure actuelle de demande d'agrément pour l'utilisation d'OGM du groupe II, classe 3 et du groupe II, classe 4

- Obligation de déposer en préfecture ou en mairie un dossier d'information portant sur

- La recherche et sa finalité
- Le classement de l'OGM
- Les moyens de confinement et les mesures prévues en cas d'accident

Sanctions

- Utilisation d'OGM sans agrément : deux mois à un an de prison et une amende de :

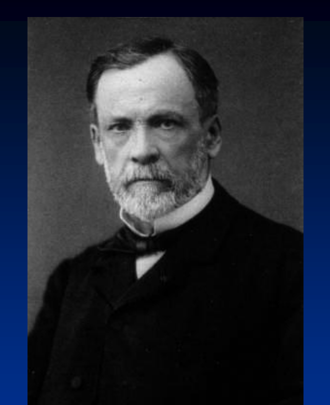
  500 à 100 000 euros.

- Récidive : deux mois à deux ans de prison et 3500 à 150 000 euros d'amende

- Utilisation d'OGM malgré une suspension : deux mois à un an de prison et une amende de 3500 à 150 000 euros.

Questions ?

QGM

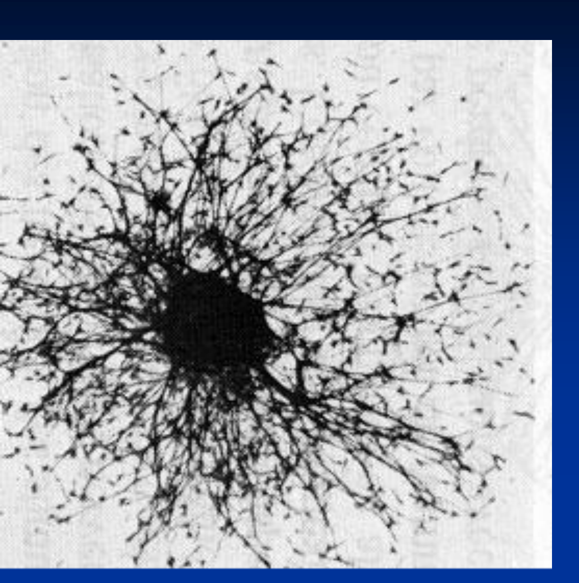


Historique des cultures cellulaires

1885	Roux	première culture cellulaire
1907	Harrison	démonstration de la doctrine neuronale
1912	Carrel	culture long terme grâce aux conditions aseptiques
1948	Earle	premiers clones cellulaires
1952	Gey et ses collègues	première lignée continue HeLa
1961	Hayflick et Moorhead	mise en évidence de l 'apoptose
1968	Dulbecco, Stocker et Green	premières transformations cellulaires par des virus
1975	Köhler et Milstein	premières lignées cellulaires d 'hybridomes

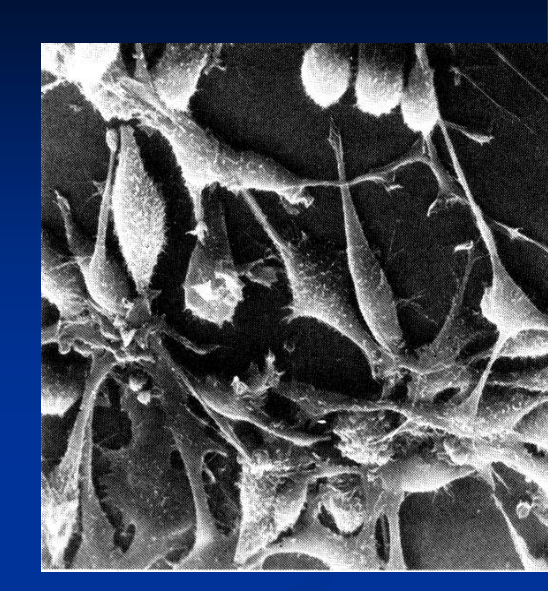
C. Bleux - CNRS

Cultures primaires



Explants

Cellules dissociées



Cultures de lignées cellulaires

Hybridomes B, T

Lignées immortalisées

- Tissus d'origine (espèce, organe)
- Mode d'immortalisation

C. Bleux - CNRS

Risques propres aux cultures primaires

- Essentiellement liés aux types de cellules prélevées:
  - Nature et origine
  - Conditions de prélèvement et de manipulation des explants

- Le risque majeur (car souvent inconnu ou mal connu) est associé à l'existence d'agents infectieux.

A T C C

American Type Culture Collection

htpp://www.atcc.org

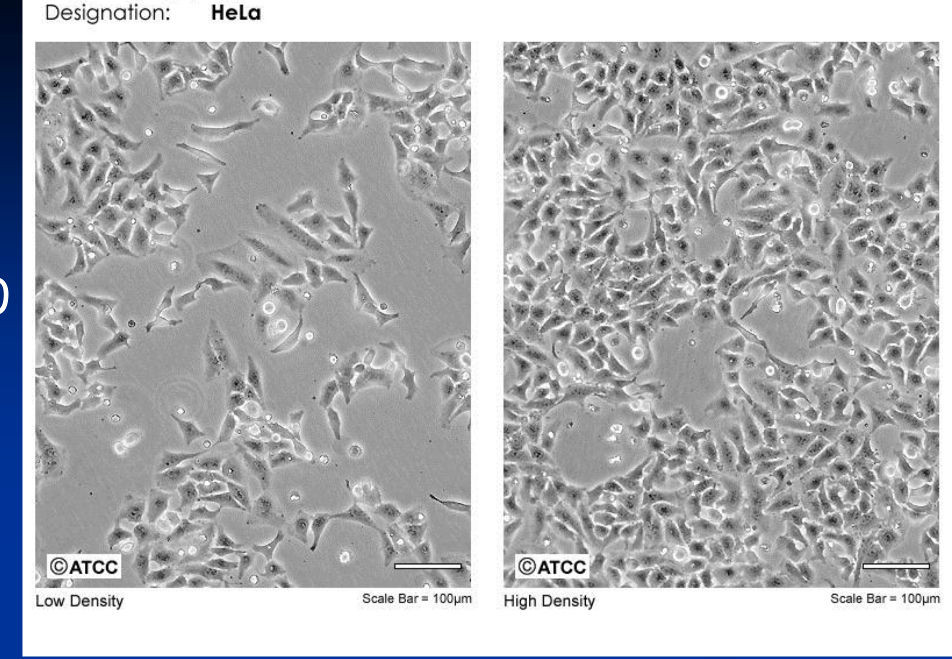
10801 University Boulevard.
P.O.Box 1549
Manassas, VA 20108 USA

E-mail : news@atcc.org

Phone: (703) 365-2700

A T C C

Cell Lines



ATCC Number: CCL-2 Price: $175.00

Designation: HeLa

Depositors: WF Scherer

Biosafety Level: 2

Medium & Serum: See Propagation

Growth Properties: adherent

Organism: Homo sapiens (human) Morphology: epithelial

Tissue: cervix; epithelial; adenocarcinoma

Cellular Products: keratin

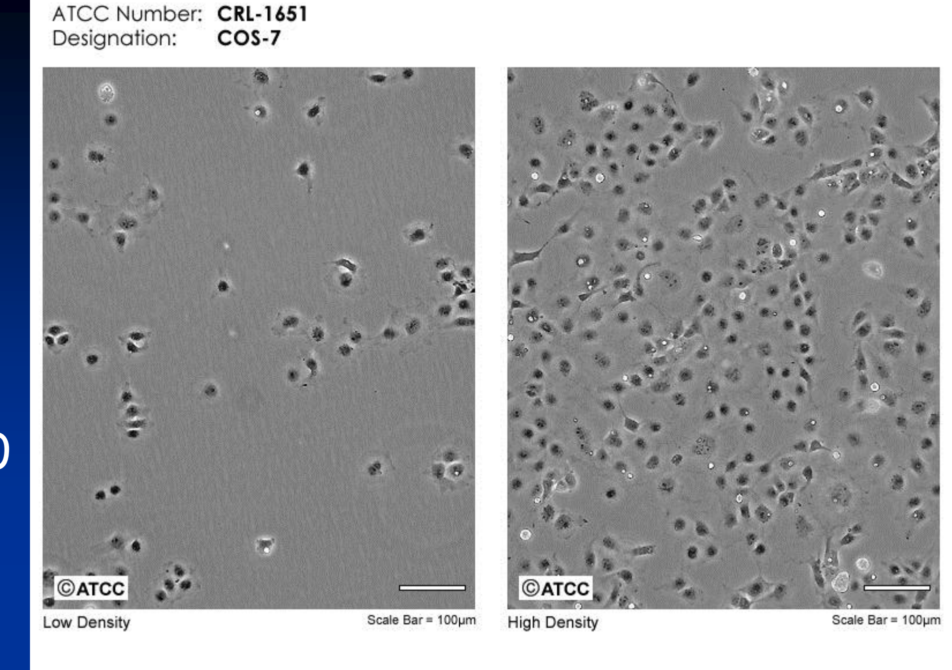
HeLa cells have been reported to contain human papillomavirus 18 (HPV-18) sequences.

Lysophosphatidylcholine (lyso-PC) induces AP-1 activity and c-jun N-terminal kinase activity (JNK1) by a protein kinase C-independent pathway [26623]

Permits/Forms: In addition to the MTA mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please click here for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

A T C C

Cell Lines



ATCC Number: CRL-1650 Price: $175.00

Designation: COS-1
Depositors: Y Gluzman
Biosafety Level: 2
Morphology: fibroblast
Medium & Serum: See Propagation Growth Properties: adherent

Organism: Cercopithecus aethiops (monkey, African green)
Tissue: kidney; SV40 transformed
Cellular Products: T antigen
Permits/Forms: In addition to the MTA mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please click here for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

Risques Communs
Milieux de culture et additifs

- sérums d'origine diverse (veau fœtal, nouveau né et adulte, liquide amniotique, ascite, sang ombilical…
- Antibiotiques et antifongiques
- Agents promoteurs de tumeurs (ester de phorbol…)
- Agents mitogènes (Con A, LPS…)
- Agents activateurs (Ionophores…)
- Hormones, facteurs de croissance

Risques liés aux agents biologiques synthétisés par les cellules

Production de substances relevant de la pathologie humaine:

- adénovirus, EBV, cytomégalovirus, papillomavirus…

Autres agents pathogènes:

- parasites: plasmodium, hémocystes, trypanosomes…
- bactéries: mycobactéries, mycoplasmes, brucella…

Risques Communs
Liés à la manipulation des cellules

Sortie de zone de confinement stérile primaire

- Collecte des cellules (aérosols)
- Isolement des molécules biologiques synthétisées
- Analyse ou tri des cellules
- Etudes biochimiques
- Injection des cellules ou d'extraits cellulaires aux animaux

Risques associés à la conservation des lignées cellulaires

Manipulations

- Azote liquide
- DMSO
- Tubes cryogéniques


Questions ?

Risques liés à l'expérimentation animale





- Risque lié à l'animal, porteur (sain) de ses propres contaminants et dont certains peuvent être transmis à l'homme (risque de zoonose)
- Risque résultant de l'expérimentation entreprise sur l'animal: inoculation de germes pathogènes

La contamination

- Voie transtégumentaire : morsure, griffure, piqûre
- Voie muqueuse : projections infectantes, aérosols…
- Voie digestive : mauvaise hygiène

Risques liés à l'expérimentation animale
Prévention
Animaux

- Animaux provenant d'élevages contrôlés
- Quarantaine et contrôle sérologique des animaux
- Abattage immédiat des lots suspects et/ou contaminés
- Séparation des espèces

- Surveillance vétérinaire des animaux
- Vaccination si nécessaire et si possible
- Désinfection régulière des cages et des locaux
- Lutte contre les insectes, les acariens et les rongeurs

- Elimination rapide des déchets

Risques liés à l'expérimentation animale
Prévention
Hommes

- Surveillance médicale à l'embauche puis régulière (visites médicales de prévention)
- Vaccination antitétanique obligatoire et vaccinations appropriées
- Bonnes pratiques: utilisation de protections individuelles Adaptées
- Connaissance des risques encourus
- Elaboration et affichage de consignes claires à mettre en oeuvre en cas d'incident ou d'accident

Risques liés à l'expérimentation animale
Prévention

Personnel de recherche

- Le responsable scientifique du projet (rang A) doit posséder une autorisation de niveau I (formation de 15 jours consécutifs par un organisme dont le programme est agréé)

- Le personnel technique participant à l'expéri-mentation animale doit travailler sous la responsabilité du rang A et justifier d'une formation de niveau II (formation d'1 semaine)

Risques liés à l'expérimentation animale
Prévention

Personnel d'animalerie

- Le personnel animalier ne participant pas au protocole expérimental doit justifier d'une formation de niveau III (formation d'1 semaine)

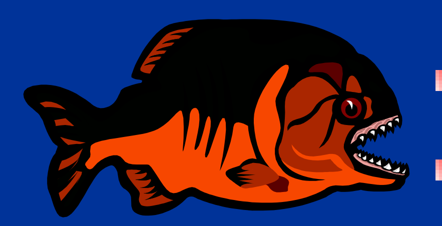
- Le personnel technique (rang B) responsable d'élevage d'espèces non domestiques doit être titulaire d'un certificat de capacité propre à l'élevage déclaré, délivré par le Ministère de l'environnement

C. Bleux - CNRS

Expérimentation animale
Obligations réglementaires
Animalerie

- Les locaux d'animalerie doivent être agréés par la Direction des Services Vétérinaires dépendant du Ministère de l'Agriculture et soumis à un décret préfectoral d'ouverture

- Mise en place et tenue à jour systématique d'un registre des entrées et sorties d'animaux



  - 1 pour les souches non domestiques
  - 1 pour les souches domestiques

cerfa

N° 50-4340

DEMANDE D'AUTORISATION D'EXPÉRIMENTER SUR ANIMAUX VIVANTS

Décret n° 87-848 du 19 octobre 1987
relatif aux expériences pratiquées sur les animaux
Arrêté interministériel du 19 avril 1988
fixant les conditions d'attribution
de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux

Cadre réservé à l'Administration

Demande n° :
Arrivée le :
Report le :
Report le :
Autorisation délivrée le :
Autorisation n° :
Autorisation refusée le :

Demande à adresser en un exemplaire à : →
Un exemplaire de la présente demande doit également être adressé au ministère dont relève l'activité principale du demandeur.

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE
Direction Générale de l'Alimentation
Sous-Direction de la Santé et de la Protection Animales
175, rue du Chevaleret
75646 PARIS CEDEX 13

La demande doit être accompagnée d'un extrait de casier judiciaire n° 3 datant de moins de trois mois et d'une attestation sur l'honneur que le demandeur n'a pas subi de condamnation pour infraction aux dispositions législatives et réglementaires afférentes à la protection des animaux, ni de condamnation pénale ou disciplinaire pour des faits contraires à l'honneur ou à la probité.

A. IDENTIFICATION DU DEMANDEUR

Nom patronymique (nom de naissance) : BLEUX
Nom d'usage* (facultatif) :
Prénoms : Christian, Yves
Date de naissance : 21 / 11 19 50
Société ou organisme dont dépend le demandeur : Centre National de la Recherche Scientifique
Grade du demandeur (pour les personnes du secteur public) : Chargé de recherche 1ère classe

* Nom d'usage, c'est-à-dire : nom de l'époux(se), veuf(ve), divorcé(e) ; nom de l'autre parent, accolé au nom patronymique.

B. IDENTIFICATION DE L'ÉTABLISSEMENT D'EXPÉRIMENTATION ANIMALE* OÙ EXERCE LE DEMANDEUR

Dénomination et adresse de l'établissement

Institut Jacques Monod
CNRS - Université Paris 7
2 Place Jussieu - TOUR 43
75251 PARIS Cedex 05

N° SIRET de l'établissement
18 00 89 013 APE / 9311

Ministère(s) dont relève l'activité de l'établissement
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Société ou organisme dont dépend l'établissement
Centre National de la Recherche Scie[ntifique]

Nom, prénoms du directeur ou du responsable de l'établissement
RICARD Jacques.

* Établissement d'expérimentation animale = ensemble des locaux d'hébergement et d'utilisation des animaux et des locaux rattachés (laverie, stockage et préparation de l'alimentation, laboratoires d'analyses, etc.) d'une unité de fonctionnement à vocation scientifique autour d'un même responsable, sur un même site, et dans laquelle on pratique des expériences sur les animaux ; n'inclut pas les locaux d'hébergement où est pratiquée la production d'animaux.

C. FONCTION DU DEMANDEUR AU SEIN DE L'ÉTABLISSEMENT

Chercheur au sein d'une équipe composée de 6 personnes. Participation à un programme de recherche fondamentale.

D. FORMATION DU DEMANDEUR*

1. **Formation initiale :**

X diplôme sanctionnant un enseignement supérieur scientifique de 4 années au moins
enseignement supérieur scientifique de 2 années validé, complété par 5 années d'expérience professionnelle
licence dans une spécialité se rapportant aux sciences biologiques

2. **Formation complémentaire spéciale sur l'animal de laboratoire** (obligatoire) :

formation spécialisée
X expérience professionnelle de 2 années 23 ans.

* Joindre les copies certifiées conformes des titres, certificats et diplômes de la formation initiale.
Joindre les copies certifiées conformes des diplômes ou des certificats de stages de la formation spécialisée.

C. Bleux - CNRS

E. DOMAINE(S) D'ACTIVITÉ DU DEMANDEUR

Recherche fondamentale ☒ Recherche médicale humaine ☐ Recherche zootechnique et médicale vétérinaire ☐ Essais d'efficacité ou d'innocuité de médicaments, d'autres substances chimiques ou de produits biologiques ☐ Contrôle de qualité des denrées alimentaires ☐ Diagnostic ☐ Enseignement ☐ Autres ☐ *(préciser)*

Justification sommaire des expériences menées (nécessités administratives et/ou scientifiques) :

La souris est un animal extrêmement bien connu et étudié (MHC, Ig, TcR) et dont le système immunitaire présente de grandes analogies avec le système humain.
Les souris transgéniques permettent l'étude d'un grand nombre de mécanismes biologiques et dans le cadre de l'étude effectuée au laboratoire, l'approche des relations foeto-maternelles.

Suite sur papier libre

F. ESPÈCES ANIMALES UTILISÉES OU DONT L'UTILISATION EST ENVISAGÉE PAR LE DEMANDEUR

[1] SOURIS [2] RAT [3] COBAYE [6] LAPIN [13] EQUIDES
[15] OISEAUX [17] AMPHIBIENS [ ] [ ] [ ]

Compléter les cases avec les numéros de code affectés aux espèces animales. Préciser les espèces si nécessaire. Souris (1), rat (2), cobaye (3), hamster (4), autres rongeurs (5), lapin (6), primates (7), chien (8), chat (9), autres carnivores (10), porc (11), ruminants domestiques (12), équidés domestiques (13), autres mammifères (14), oiseaux (15), reptiles (16), amphibiens (17), poissons (18).

Justification sommaire du choix des espèces animales utilisées :

Souris : - Utilisées en transgénèse dans l'étude des relations foeto-maternelles.
- Production d'anticorps monoclonaux.
- Immunisation d'antigènes ou de produits immuno régulateurs.

Lapins : Production d'anticorps polyclonaux.
Cobayes : Source de complément.
Oiseaux et amphibiens : Comparaison phylogénique avec la souris ou l'homme.

Suite sur papier libre

G. TYPES DE PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX MIS EN ŒUVRE SUR LES ANIMAUX PAR LE DEMANDEUR

Interventions chirurgicales (dans ce cas, une formation en chirurgie des animaux est exigée) ☐ Administration de substances sur animaux vigiles ☒ Examens cliniques sur animaux vigiles ☒ Examens cliniques sur animaux anesthésiés ☒ Examens et prélèvements sur animaux euthanasiés ☒ Conditionnement, apprentissage ☐ Autres interventions ☐ *(préciser)*

À Paris, le 18 Avril 1995 Signature du demandeur :



ATTESTATION DE STAGE

FORMATION SPECIALE A L'EXPERIMENTATION ANIMALE POUR LES CADRES BIOLOGISTES
- Niveau 1-

approuvée par décision du Ministère de l'agriculture et de la pêche en date du 27 janvier 1994

Je soussigné, Jean-Yves GAUTIER, Président du GRETA LOIRET CENTRE certifie

que Monsieur BLEUX Christian

a suivi la formation spéciale à l'expérimentation animale du 3 au 14 avril 1995.

Le programme de cette formation a été celui défini par l'arrêté du 18 avril 1988.

Monsieur BLEUX Christian a subi avec succès l'évaluation de fin de stage.

Fait à Orléans, le 19 avril 1995

Le Président du GRETA,

J. Y. GAUTIER

C. Bleux - CNRS

CERTIFICAT D'AUTORISATION D'EXPERIMENTER
SUR ANIMAUX VERTEBRES

articles L214-3, L215-6, L215-7, R214-87 à R214-122 et R215-10 du Code Rural
Arrêté du 19 avril 1988
fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux

NUMERO DE L'AUTORISATION : **75-1157**

Monsieur BLEUX Christian, Yves

Université Paris 6, Pierre et Marie Curie
Service Commun d'Animalerie de l' IFR 83 de Biologie Intégrative
7, quai Saint-Bernard
75005 PARIS

est autorisé à réaliser des expériences sur animaux vertébrés vivants dans les conditions suivantes :

DOMAINES D'ACTIVITE

Recherche fondamentale.

TYPES DE PROTOCOLES EXPERIMENTAUX MIS EN OEUVRE ET ESPECES ANIMALES UTILISEES

ADMINISTRATION DE SUBSTANCES SUR ANIMAUX VIGILES. Souris, Rat, Cobaye, Lapin, Ruminants domestiques, Oiseaux, Amphibiens.
EXAMENS CLINIQUES SUR ANIMAUX VIGILES OU ANESTHESIES. Souris, Rat, Cobaye, Lapin, Ruminants domestiques, Oiseaux, Amphibiens.
EUTHANASIE DES ANIMAUX EN VUE D'EXAMENS ET/OU DE PRELEVEMENTS. Souris, Rat, Cobaye, Lapin, Ruminants domestiques, Oiseaux, Amphibiens.

La présente autorisation est **valable jusqu'au 01 mai 2011.**

Fait à Paris, le 02 mai 2006

Pour le PREFET DE POLICE et par ordre,
Le Directeur Départemental
des Services Vétérinaires de Paris

SERVICES VETERINAIRES PARIS

Mentions importantes au verso



Bureau de l'Expérimentation Animale
François LACHAPELLE, responsable
Brigitte LERAT-RAULT, Dr.vétérinaire(DVM)



Institut national
de la santé et de la recherche médicale

BEA n° 2008/BR/165

Paris, 2008-09-23

Certificat Sanitaire de Transport/ health certificate

Je soussignée, *Brigitte Rault,* Docteur Vétérinaire inscrit à l'Ordre sous le numéro : 20203, certifie que les prélèvements (40 testicules de rats, 20 testicules de souris fixés) faisant l'objet du présent envoi proviennent d'animaux régulièrement dépistés pour les principaux pathogènes auxquels ils sont sensibles et ne présentent pas de signes cliniques de maladie contagieuse/ *I, the undersigned, Brigitte Rault, DVM, (veterinary order number 20203) certify the tissues (40 rat testiclesand 20 mice testicles) have been taken from animals regularly monitored for pathogens and are clinically healthy.*

Destinataire/*sent to*: Université de la Nouvelle-Calédonie.
Site de Nouville.
BPR4 - 98851 Nouméa Cedex

VIA JAPAN

Le matériel transite par le Japon

L'INSPECTEUR EN CHEF
DE LA SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE
Dr CLAUDETTE CROCHET

J'atteste, en outre, que les prélèvements ci-dessus désignés ne font l'objet d'aucune transaction commerciale et sont destinés seulement à des fins de recherche biomédicale et d'enseignement/*I further certify that thes tissues are not the subject of a commercial transaction and are destined only for biomedical research and teaching.*

DIRECTION DEPARTEMENTALE
DES
SERVICES VETERINAIRES DE PARIS
20 - 32 rue de Bellevue - 75019 Paris
Tél. 01 53 38 77 68 - Fax 01 53 38 77 70

Le 23 septembre 2008

L'INSPECTEUR EN CHEF
DE LA SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE
Dr CLAUDETTE CROCHET

Brigitte RAULT
Docteur - Vétérinaire
BEA INSERM
Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière
91 Boulevard de l'Hôpital
75634 Paris Cedex 13

Brigitte RAULT

Bureau de l'Expérimentation Animale INSERM
Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière, 91 boulevard de l'Hôpital - 75634 PARIS Cedex 13
Téléphone : 01 40 77 81 54 – 01 40 77 81 55 - Télécopie : 01 40 77 96 97
e-mail : brigitte.rault@chups.jussieu.fr





Questions ?







Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC



ESST
Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles

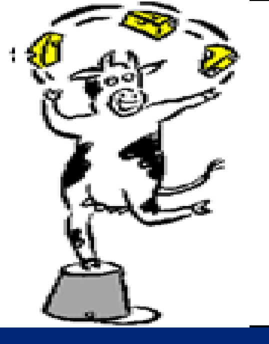
Encéphalopathies… maladies caractérisées par une dégénérescence du SNC,

…**Spongiformes**… la dégénérescence s'accompagne de la mort des neurones, conduisant à des « vides » comparables aux trous d'une éponge,

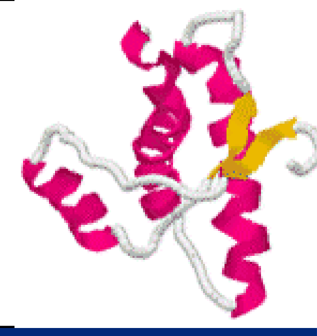
…**Subaiguës**… après une phase de latence plus ou moins longues (10 à 30 ans), dès l'apparition des signes cliniques, elles évoluent vers la mort en quelques mois,

…**Transmissibles**… ces maladies ne sont pas contagieuses mais peuvent être transmises à partir de tissus contaminés à l'animal d'expérience ou à un être humain sous certaines conditions.

C. Bleux - CNRS



Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC



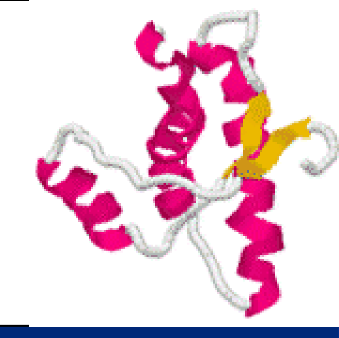
ESST **humaines** et animales

- Kuru
- Maladie de Creutzfeldt-Jakob (sporadique 1920, familiale 1992, iatrogène)
- Syndrome de gerstmann-straüssler-Scheinker (1936)
- Insomnie fatale familliale (1966)
- Nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

- Tremblante du mouton (scrapie) (1732)
- Encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (1986)
- Encéphalopathie du vison (1995)
- Maladie du déperissement chronique (1996)



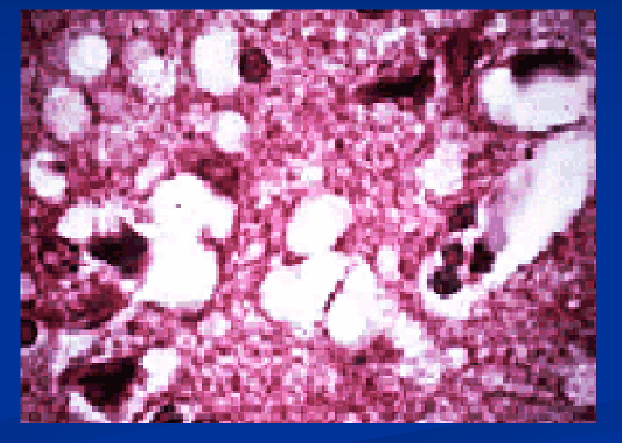
Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC



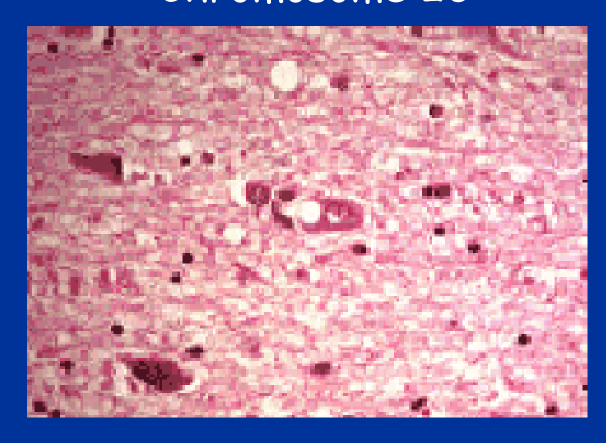


Chromosome 20

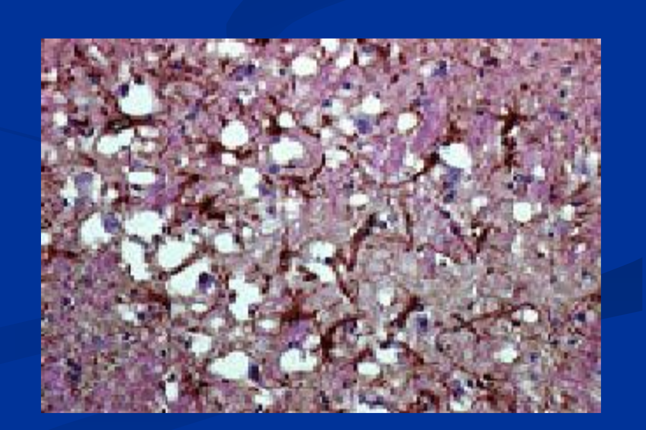
253 AA
SGP 33 - 35 kDa
2 sites de glycosylation
15 – 40 nm



Kuru



CJD

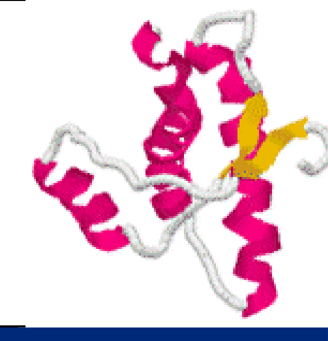


Scrapie

C. Bleux - CNRS



Les Prions (Proteinaceous infectious particles) ATNC



Le prion passe la barrière d'espèce **(nvMCJ)**

Transmission expérimentale inter-espèces

Singes Sup.

Singes

Porc

Caprins tremblante

GSS

Kuru

FFI

MCJ

Vison TME

Bovins BSE

Chat

Ovins Tremblante

Cobaye

Souris

hamster

Nombre de cas certains ou probables de MCJ en France par année de signalement pour les suspicions, par année de décès pour les cas de MCJ décédés

Mise à jour du 12 décembre 2007

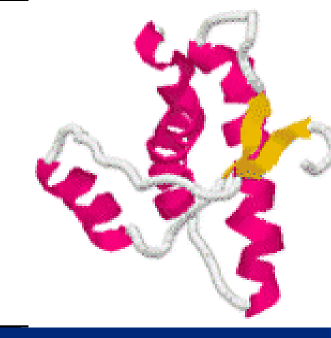
Année	Suspicions signalées	MCJ sporadique décédé	MCJ iatrogène hormone de croissance décédé*	Autre MCJ iatrogène décédé	MCJ génétique décédé	vMCJ certain ou probable décédé	vMCJ probable non décédé	Total MCJ
1992	71	38	7	2	4	0	0	51
1993	63	35	12	1	7	0	0	55
1994	93	46	5	3	7	0	0	61
1995	114	59	8	1	6	0	0	74
1996	201	68	10	0	10	1	0	89
1997	296	80	6	1	4	0	0	91
1998	459	81	8	1	13	0	0	103
1999	590	92	8	0	5	0	0	105
2000	823	87	9	0	8	1	0	105
2001	1103	110	5	0	15	1	0	131
2002	1062	108	2	2	13	3	0	128
2003	1086	108	8	1	10	0	0	127
2004	881	97	8	0	9	2	0	116
2005	930	82	4	1	10	6	0	103
2006	1315	125	5	0	8	6	0	144
2007	1032	64	0	0	4	2	0	70

* Les 4 premiers décès de MCJ iatrogènes par hormone de croissance extractive sont survenus en 1991.

C. Bleux - CNRS



Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC



Résistance à toutes les méthodes d'inactivation conventionnelles

Chaleur sèche,

chaleur humide,

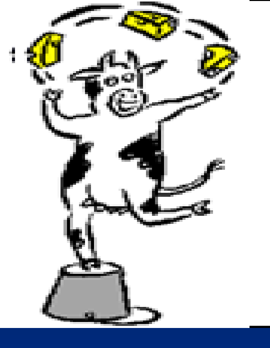
radiations ionisantes,

ultrasons, ultraviolets,

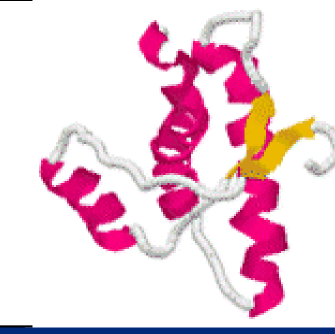
digestions nucléases,

agents chimiques.

C. Bleux - CNRS



Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC



Organismes à risques

- Patients atteints d'EST et leur famille
- Intervention neurochirurgicale
- Exploration cérébrale invasive
- Greffe de cornée ou dure-mère (sauf en France et depuis 1995)
- Traitement par hormone hypophysaire
- Animaux avec EST ou engagés dans une contamination

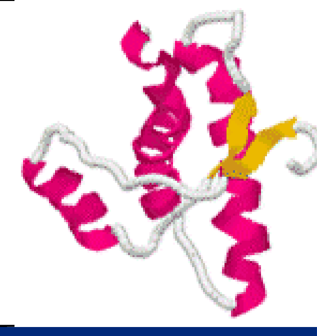
Organes à risques

- Cerveau, moelle épinière, œil
- Organes lymphoïdes, placenta

C. Bleux - CNRS

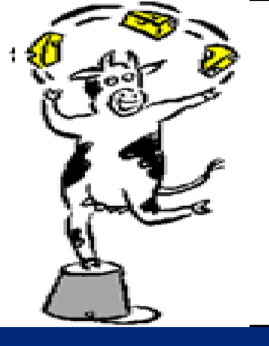


Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC

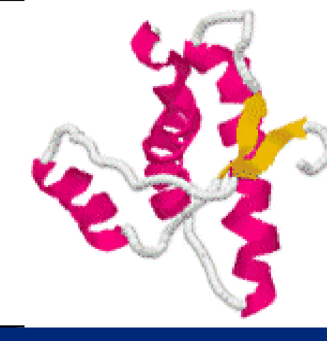


Voies de contamination au laboratoire

- **Pas de contamination**
- A travers une peau saine ???
- Par voie respiratoire ???
- **Contamination possible**
- Voie intramusculaire ou sous-cutanée après blessure par outil coupant, piquant
- Voie oculaire par projection de PrPsc ou de prélèvements biologiques très infectieux
- Voie digestive lors de manipulation de préparations concentrées de PrPsc ou d'échantillons biologiques très infectieux



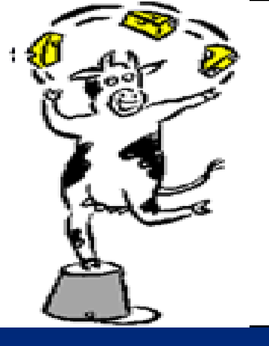
Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC



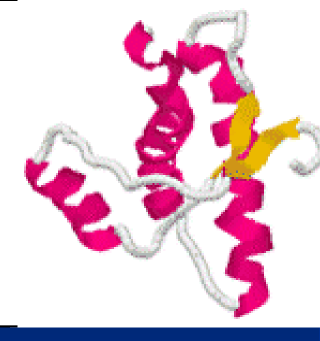
Consignes minimum de protection

- Prélèvements très infectieux
- Cultures d'OGM exprimant la PrPsc
- Préparation de PrPsc

- Port de lunettes de protection ou de visières anti-projections
- Port de doubles gants latex



Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC



Consignes minimum de protection

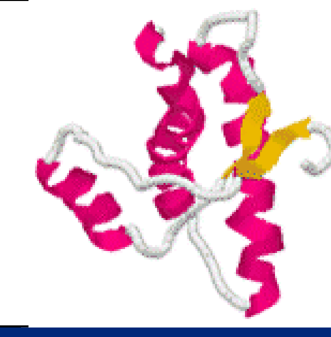
Anatomopathologie et autopsies

- Scie Strycker protégée
- Gants renforcés fils métalliques
- Visière anti-projections
- Tablier à usage unique sur blouse
- Rasoir de microtome jetable

C. Bleux - CNRS



Les Prions
(Proteinaceous infectious particles)
ATNC



Décontamination du matériel souillé
Protocole OMS

	Organisme à risque important	Organisme à risque faible
Tissus très infectieux	•Détergent sans aldéhydes •NaOH 1M ou Javel 2°cl •Autoclavage 134°C. 20 min	•Détergent sans aldéhydes •NaOH 1M ou Javel 2°cl ou Autoclavage 134°C.20 min
Tissus peu infectieux	•Détergent sans aldéhydes •NaOH 1M ou Javel 2°cl ou autoclavage 134°C.20min	•Détergent sans aldéhydes •NaOH 1M ou Javel 2°cl ou autoclavage 134°C. 20 min



Questions ?

Le laboratoire L3

Conception du laboratoire

- Accès au laboratoire par un sas. L'aménagement de ce sas devra comporter:
- - des vestiaires (changement de blouse et port d'EPI)
- - une douche,si possible, pour permettre la décontamination du personnel en cas d'accident
- Filtration de l'air extrait sur filtre absolu de type HEPA
- Fenêtres du laboratoire incassables et scellées hermétiquement
- Maintient du L3 en dépression par rapport aux zones voisines

Le laboratoire L3

Conception du laboratoire, suite

- Alarme signalant tout changement de pression
- Présence d'un système permettant l'inactivation des effluents des éviers et des douches
- Etanchéité du local obligatoire permettant la désinfection par fumigation
- Présence d'un groupe électrogène de secours vivement conseillée
- Lutte contre les insectes et les rongeurs

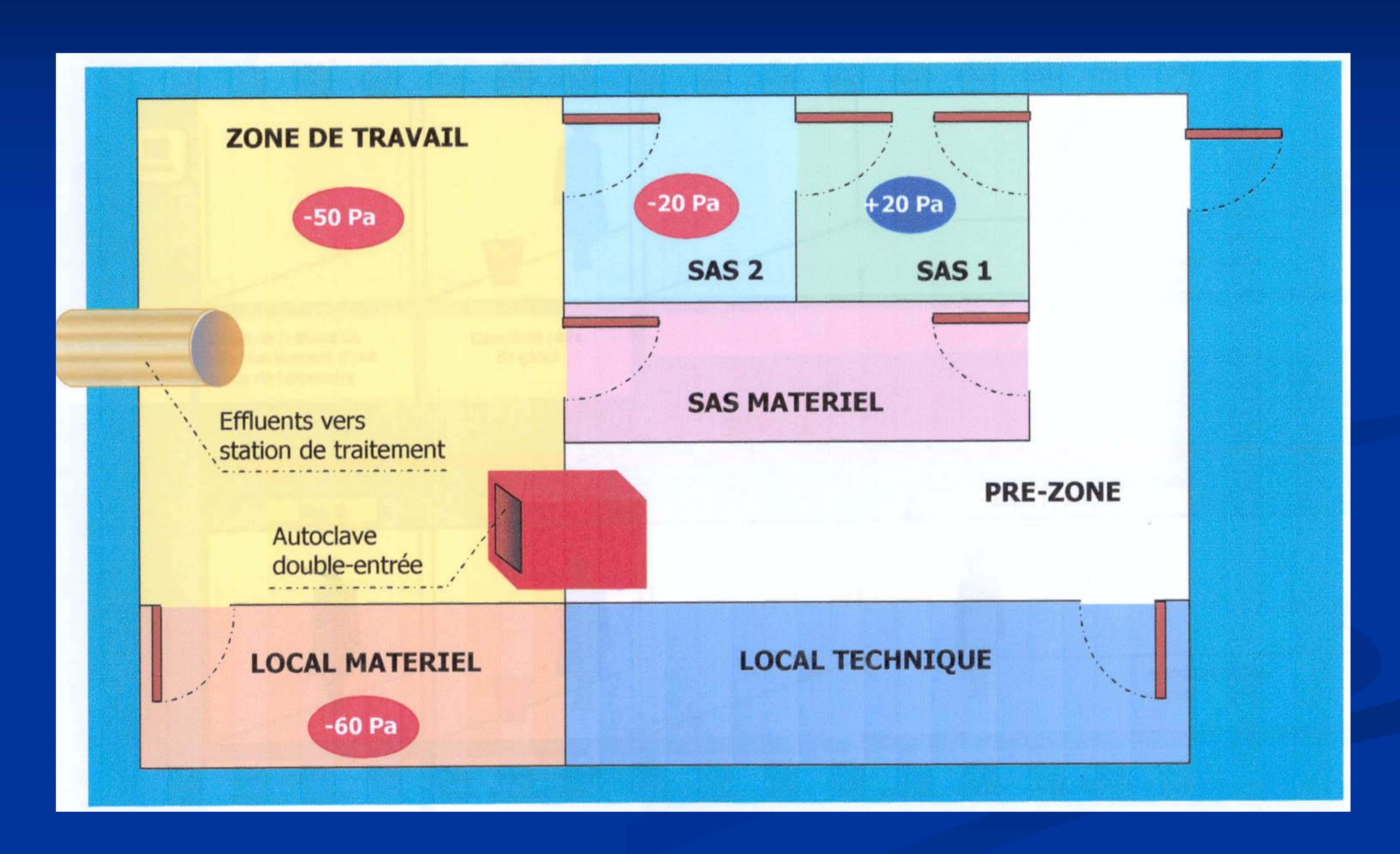
Le laboratoire L3

Bonnes pratiques de laboratoire

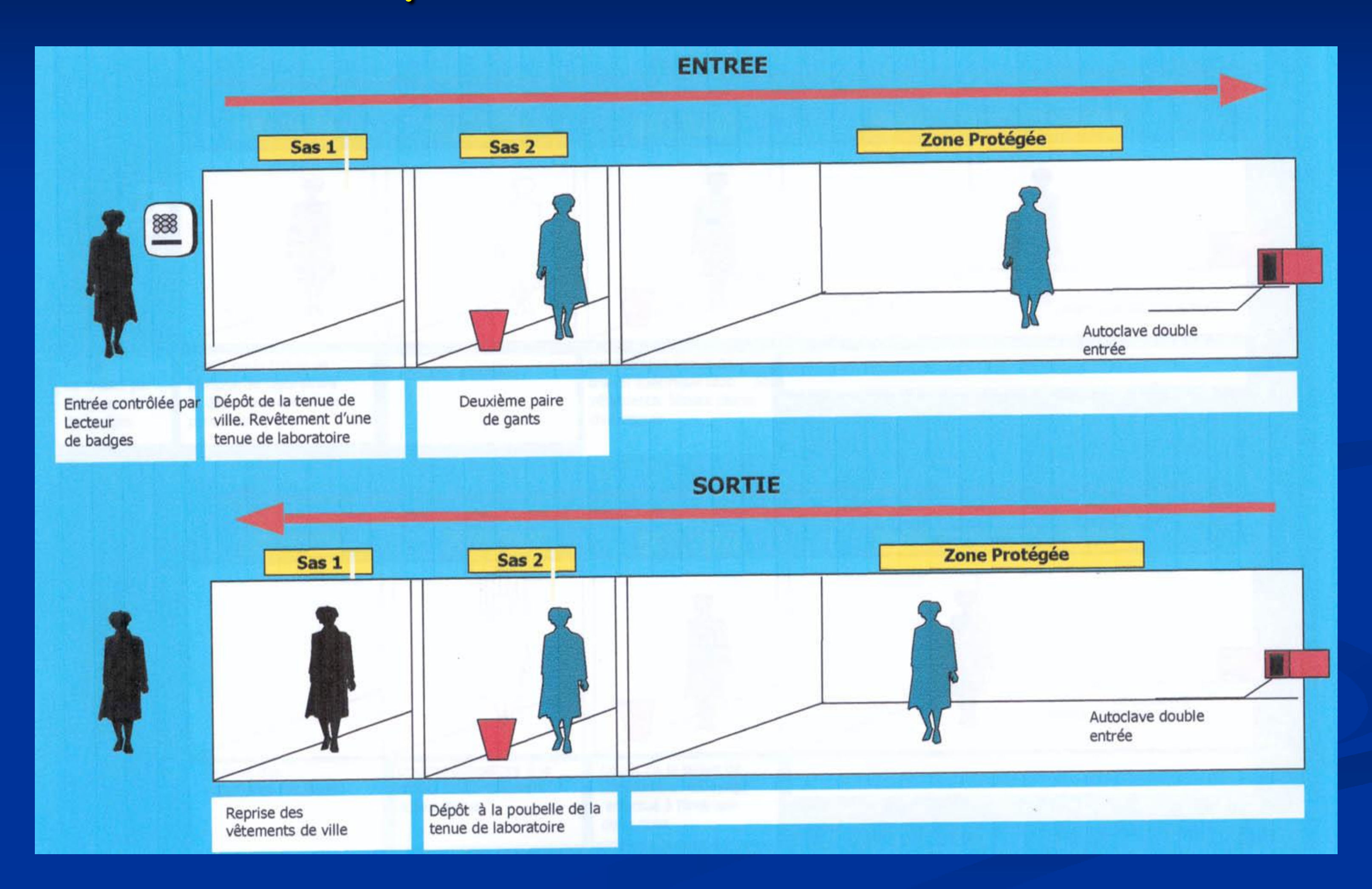
- Connaître les consignes de sécurité et la conduite à tenir en cas d'incident ou d'accident
- Port de blouses jetables ou de blouses spéciales identifiables
- Port de gants, de coiffe et de surbottes obligatoires
- Inactivation du matériel contaminé et des déchets par autoclavage

C. Bleux - CNRS

Le laboratoire L3



Le laboratoire L3
Principe d'utilisation des sas



Les lentivecteurs

Note aux manipulateurs pour la production et/ou l'utilisation de vecteurs lentiviraux

- Devoir de connaître très précisément la nature des constructions lentivirales et de transcomplémentation ainsi que le classement de la séquence insertionnelle clonée dans le lentivecteur
- En effet, la manipulation de ces lentivecteurs n'est pas dénuée de risques … et………
- ……L'évaluation des risques par la CGG est largement plus exigeante que celle des vendeurs de réactifs pour laboratoires

Vecteurs lentiviraux de deuxième génération - vecteurs SIN ou ΔU3

- Produits à l'aide de plasmides de transcomplémentation dépourvus des gènes régulateurs (Vpr, Vpu, Nef et Vif) dans des cellules HEK 293T ou équivalente
- Les gènes viraux Tat et Rev restent exprimés en phase de production
- L'élément de vectorisation du transgène ne doit plus contenir de séquences régulatrices de la transcription dans la séquence U3 de la LTR3'

Vecteurs de classe 2

Conditions d'utilisation des lentivecteurs SIN ou ΔU3

- Transgène de type B → production et transduction des cellules cibles en L3
- Cellules transduites cultivées une semaine en L3 → surnageant de culture soumis à un test ELISA pour détection de la capside du HIV ou SIV (CAp24/25)
- ELISA négatif → sortie des cellules transduites vers confinement L2

Conditions d'utilisation des lentivecteurs SIN ou ΔU3

- Insert de type A ⟶ production et transduction des cellules cibles en L2 en respectant quelques précautions supplémentaires
  - Port de gants
  - Port de masque de protection
  - Port d'une casaque à fermeture dorsale
  - Inactivation sous le PSM2 des déchets liquides
  - Elimination après chaque manip des déchets (L & S)
  - Autoclavage des déchets solides immédiatement après la sortie du L2
  - Production lentivirale inférieure ou égale à 200ml de surnageant brut non purifié et non concentré
  - Incubateur dédié uniquement à ces cultures
  - Récupération et concentration des suspensions virales par centrifugation ou par filtration *in situ*

Conditions d'utilisation des lentivecteurs SIN ou ΔU3 exprimant un ou plusieurs ARN interférents

- Lentivecteurs ciblant
  - Un oncogène
  - Un anti-oncogène
  - Un gène pro-apoptotique
  - Un gène anti-apoptotique
  - Banque de sh RNA

↓

Inserts de type B

Plasmide de transcomplémentation Structure du vecteur	Type d'insert	Production	Classement	Cellules transduites
Séquences de transcomplémentation exprimant les gènes accessoires (Vif, Vpu, Vpr et Nef)	A ou B	L3	GIIC3L3	L3 Jusqu'à vérification ELISA de l'absence de particules puis L2
Séquences de transcomplémentation n'exprimant pas les gènes accessoires (Vif, Vpu, Vpr et Nef) Vecteur SIN (ΔU3)	A	L2	GIIC2L2	L2
	A	L3 plus de 200ml	GIIC2L3	L2
	B	L3	GIIC2L3	L3 puis L2
	Sh RNA « oncogène » ou banque non caractérisée	L3	GIIC2L3	L2
	Sh RNA	L2	GIIC2L2	L2

C. Bleux - CNRS